

Research Report

Keberhasilan Metode Ekstraksi *FTATM Paper* pada pemeriksaan DNA *Bitemark* Locus *TH01*, *vWA* di Bidang Kedokteran Gigi Forensik

The Success of FTATM Paper Extraction Method on Bitemarks DNA Identification Locus TH01, vWA in Odontology Forensic

*Michael Natanael Winarko, **Agung Sosiawan, **Sophia Eleonora

*Mhs Strata 1

**Staff Departemen Biologi Oral

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

Surabaya – Indonesia

ABSTRACT

Background. Forensic case often encountered bitemark evidence that was found on the victim's or perpetrator's body. Bitemark can be compared with the tooth model of suspected person physically. However, this technique may cause subjective interpretations. Therefore, an alternative technique to identify the bitemark case was used. The biological evidence from bitemark may be taken by irrigating the bitemark to collect the saliva and buccal epithelium deposited during biting so that the DNA from the suspected person can be identified. In the fact DNA material that has been found was very limited and might be degraded, less both in quantity and quality. Due to that, an effective method to extract the DNA material is needed. **Purpose.** Proving the success of DNA extraction with *FTATM Paper* method through PCR-Short Tandem Repeat (STR) on *TH01*, *vWA* loci. **Method.** Blood and bitemark samples were taken from 5 persons, each sample was extracted with *FTATM Paper* method. When a sample is applied to the *FTATM Paper* the cell membranes are lysed, the nucleic acids are released and the DNA is entrapped within the fibres of the cards' matrix. Purification/extraction of the DNA is simple (only requiring a series of wash steps). This means that DNA quantitation need not and cannot be measured/performed for samples extracted from *FTATM Paper*. DNA samples were amplified with PCR which *vWA* and *TH01* loci were as the target. Visualizing band appearances were using 6% polyacrylamide gel electrophoresis. **Result.** Electrophoresis visualisations show band appearances of *vWA* and *TH01* loci from blood and bitemark samples which mean the *FTATM Paper* method can be used for bitemark. **Conclusion.** It was proven that *FTATM Paper* extraction can be used effectively to extract DNA from bitemark.

Keywords: bitemark, *FTATM Paper*, *vWA*, and *TH01* loci

Korespondensi (correspondence): Michael Natanael Winarko, Agung Sosiawan, Sophia Eleonora, Departemen Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Kampus A Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya. E-mail: micol_skywalker@yahoo.com.

PENDAHULUAN

Kedokteran gigi forensik sebagai bagian dari Ilmu Kedokteran forensik, akhir-akhir ini semakin terlihat peranannya, dalam upaya identifikasi korban bencana massal yang semakin meningkat,¹ maupun penegakan keadilan dan pengungkapan berbagai kasus tindak pidana di tanah air.² Kondisi ini tidak terlepas dari semakin kompleks tugas identifikasi forensik untuk saat ini dan di masa yang akan datang, seperti pada kasus

kejahatan yang disertai dengan upaya tersangka untuk menghilangkan jejak, yakni dengan memotong korban menjadi beberapa bagian, ataupun dengan membakar korban, mengakibatkan derajat kerusakan tubuh korban yang parah, sehingga tidak jarang membuat identifikasi forensik tidak dapat ditegakkan melalui barang atau sesuatu yang bersifat personal, seperti *ID documents*, jam tangan, cincin, atau yang dikenal dengan istilah identifikasi asosiatif, sehingga dibutuhkan cara

lain dalam teknik identifikasi forensik, yang memiliki keterhandalan yang tinggi, yang dapat digunakan dalam proses identifikasi personal di bidang forensik. Teknik atau cara lain dalam bidang identifikasi personal adalah melalui identifikasi dengan menggunakan gigi geligi sebagai sumber atau bahan identifikasi, atau yang lebih dikenal dengan *odontology forensic*.³

Terkait dengan gigi sebagai sumber DNA yang baik bagi analisis DNA, ternyata tidak terbatas pada gigi sebagai satu-satunya sumber DNA, melainkan juga segala sesuatu yang terkait dengan gigi sebagai sumber utama terjadinya bekas gigitan atau *bitemarks*. Meski demikian pemeriksaan DNA sebagai alat bantu dalam proses identifikasi forensik bukanlah tanpa kelemahan. Hal ini didasarkan pada suatu realita bahwa DNA akan mengalami kerusakan (*damage*), bila terpapar oleh paparan-paparan yang dapat menimbulkan kerusakan DNA seperti halnya bahan-bahan kimia, pH, temperatur, maupun paparan lainnya.⁴

Seperti diketahui proses ekstraksi DNA di bidang forensik pada dasarnya adalah proses untuk mendapatkan DNA yang nantinya digunakan sebagai bahan identifikasi forensik yang memadai. Pada proses ini tidak jarang bahan yang akan diekstraksi DNANYA tersebut memiliki jumlah yang terbatas, baik terbatas dari segi jumlah maupun dari segi kualitas.⁵

Pada penelitian ini, digunakan *Fast Technology for Analysis of nucleic acid (FTATM Paper)* untuk ekstraksi DNA. *FTATM Paper* (Whatman Inc, Clifton, NJ) adalah suatu kertas yang digunakan khusus untuk mengikat dan melindungi degradasi asam nukleat dari darah, tanaman dan ekstrak jaringan hewan dan sumber lainnya. Pada akhir tahun 1980, *FTATM Paper* dikembangkan oleh Lee Burgoyne di Universitas Flinders di Australia sebagai suatu metode untuk penyimpanan DNA.⁶ Penggunaan *FTATM Paper* sederhana meliputi penambahan sebuah bercak darah ke dalam kertas dan membiarkan noda mengering. Sel-sel menjadi lisis pada saat kontak dengan kertas dan DNA dari sel darah merah terjebak dalam *filter matrix* pada *FTATM Paper*. Potongan kecil kertas dipindahkan dari bercak darah *FTATM Paper* dan ditempatkan ke dalam tabung untuk dicuci. DNA yang terdapat pada *FTATM Paper* dapat dibersihkan dengan cara mencucinya dengan cairan pelarut (*Purification Water*) untuk membersihkan heme dan penghambat lainnya yang dapat menghambat reaksi PCR.⁵

Setelah metode ekstraksi DNA selesai, dilakukan pemeriksaan ekspresi gen dengan melihat lokus TH01 dan lokus vWA. Pada penelitian ini digunakan lokus TH01 dan lokus vWA karena merupakan lokus yang mempunyai sifat *low mutation rate* sehingga lebih efektif dalam identifikasi personal. Kedua lokus ini terletak pada kromosom yang berbeda yaitu kromosom 11 dan 12 yang merupakan syarat dalam pemilihan lokus untuk identifikasi. Primer pada PCR menggunakan lokus TH01 dan vWA sehingga dapat diperoleh ekspresi gen dari lokus ini pada elektroforesis.⁵

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah observasional laboratoris dengan pendekatan *cross sectional* yang dilakukan melalui analisis lokus pemeriksaan DNA forensik dengan teknik ekstraksi *FTATM Paper*. Sampel penelitian berasal dari 5 sukarelawan yang setuju diambil cetakan gigi dan darahnya sebagai bahan analisis DNA untuk kepentingan penelitian.

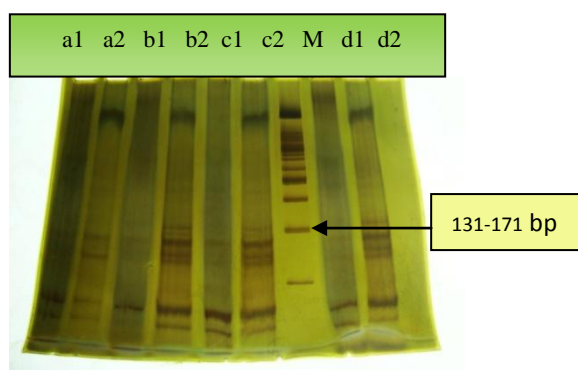
Sampel *bitemark* diperoleh dengan mencetak gigi sukarelawan dengan menggunakan alginat dan *universal tray*. Hasil dari *bitemark* pada alginat dialiri dengan aquades steril (*nuclease free water*) kemudian cairan yang berisi materi biologi rongga mulut dari *bitemark* dikumpulkan dalam tabung steril untuk dilakukan ekstraksi DNA dengan metode *FTATM Paper*. Selanjutnya diambil darah dari pasien sebanyak 2-3 cc dari *vena cubiti* sebagai kontrol kemudian dikumpulkan pada tabung steril untuk selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA dengan metode *FTATM Paper*.

Hasil irigasi pada cetakan alginat *bitemark* yang mengandung saliva pasien dan sampel darah yang telah dikumpulkan dalam tabung steril sebanyak $\pm 2-3$ cc ditetaskan pada *FTATM Paper*. Kemudian *FTATM Paper* yang telah mengandung ekstraksi DNA pasien dari sampel *bitemark* dan darah dipotong menjadi $\pm 1-2$ mm. Potongan *FTATM Paper* yang mengandung ekstraksi DNA pasien direndam di dalam *FTATM Purification Reagent* untuk menghilangkan kontaminasi zat-zat lain yang dapat mengganggu proses kinerja amplifikasi PCR dan setelah dipurifikasi, potongan-potongan *FTATM Paper* tersebut masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reagen (*PCR tube*) untuk diamplifikasi pada PCR *thermal cycler*.

Replikasi sampel menggunakan PCR *Thermal Cycler*. Kemudian hasil PCR divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis pada gel *polyacrylamide* 6%. Selanjutnya hasil visualisasi elektroforesis DNA dari darah dibandingkan dengan DNA dari *bitemark* untuk mengetahui keberhasilan dari metode *FTATM Paper*.

HASIL

Hasil pengukuran kuantitasi kadar sampel DNA pada *FTATM Paper* tidak dapat diukur dengan angka. Hal ini disebabkan oleh karena ketika sampel diteteskan diatas *FTATM Paper* sel membran akan lisis, asam nukleat akan terlepas, dan DNA akan terjebak di dalam fiber dari matrix *FTATM Paper*. Oleh karena DNA terjebak di dalam *fiber matrix FTATM Paper*, maka dapat dipastikan bahwa kadar DNA tidak ada yang berkurang sehingga tidak dapat dilakukan pengukuran kadar.



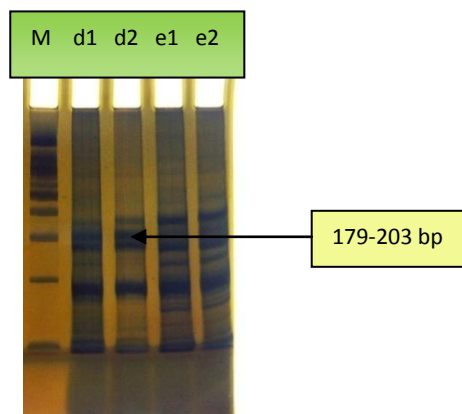
Gambar 1. Contoh hasil elektroforesis lokus vWA dari sampel 1,3,4,5

Keterangan :

M: *Marker* (*marker ladder* = 100 bp), a1: sampel 5 (darah), a2: sampel 5 (*bitemark*), b1: sampel 1 (darah), b2: sampel 1 (*bitemark*), c1: sampel 3 (darah), c2: sampel 3 (*bitemark*), d1: sampel 4 (darah), d2: sampel 4 (*bitemark*).

Tabel 1. Hasil Ekstraksi DNA pada lokus vWA

	Terdeteksi	Tidak Terdeteksi	Total
Sampel darah	5	0	5
Sampel <i>bitemark</i>	5	0	5
Total	10	0	N=10



Gambar 2. Contoh hasil elektroforesis lokus TH01 dari sampel 1 dan sampel 5

Keterangan:

M: *Marker* (*marker ladder* = 100 bp), d1: sampel 1 (darah), d2: sampel 1 (*bitemark*), e1: sampel 5 (darah), e2: sampel 5 (*bitemark*).

Tabel 2. Hasil Ekstraksi DNA pada lokus TH01

	Terdeteksi	Tidak Terdeteksi	Total
Sampel darah	5	0	5
Sampel <i>bitemark</i>	5	0	5
Total	10	0	10

Pada tabel di atas, terlihat hasil elektroforesis pada lokus vWA dan lokus TH01 menunjukkan semua sampel memperlihatkan *band* yang berarti semua sampel terdeteksi.

PEMBAHASAN

Bitemark adalah luka pada kulit yang disebabkan oleh gigitan permukaan gigi manusia atau hewan. Sampel dari penelitian ini berupa *bitemark* yang didapatkan dari hasil mencetak gigi pasien. Cara ini digunakan untuk mewakili sampel *bitemark* pada kasus forensik dimana korban mendapatkan bekas gigitan. Pada kasus semacam ini bekas gigitan dapat diidentifikasi dengan menggunakan teknik standar yaitu

membandingkan hasil foto interpretasi dengan model gigi dari tersangka yang dicurigai. Proses membandingkan *bitemark* dengan gigi geligi tersangka meliputi analisis dan pengukuran dari ukuran, bentuk, dan posisi dari masing-masing gigi.⁷

Hasil dari identifikasi tersebut tidak dapat dijadikan satu-satunya dasar identifikasi karena adanya kemiripan bentuk sehingga terjadi beberapa kasus kesalahan identifikasi. Berbagai hasil penelitian menunjukkan adanya problem dalam analisis *bitemark* karena kulit manusia bukanlah medium cetakan gigit yang baik. Di sisi lain analisis *bitemark* secara fisik biasanya susah dipecahkan, terutama karena kulit manusia yang bentuknya menggelombang, bersifat elastis, dapat terdistorsi, dan edema karena adanya *bitemark* (Sweet et al, 2001). Oleh karena itu, digunakan cara lain untuk mengidentifikasi yaitu dengan mengekstraksi DNA yang terdapat dalam *bitemark*. Pada *bitemark* pemeriksaan DNA dapat diambil dari *saliva*, *stain* yang menempel, sisa-sisa epitel mukosa pada *saliva* dan sebagainya.⁸

Selain sampel *bitemark*, terdapat sampel darah yang merupakan sampel yang umum digunakan untuk identifikasi DNA yang dipilih oleh peneliti sebagai pembanding dari sampel *bitemark*. Sampel darah dipilih menjadi sampel penelitian mengingat darah yang merupakan sumber pemeriksaan yang efektif, bahkan seringkali disebut sebagai *golden standart* untuk pemeriksaan DNA. Hal ini disebabkan karena kondisi darah yang mempunyai kadar DNA rata-rata sebesar: 20.000-40.000 ng/ μ l, sehingga sangat efektif digunakan sebagai bahan atau *spesimen* pemeriksaan DNA di bidang forensik.⁹

Sampel darah dan saliva dapat dikumpulkan pada substrat yang dikenal sebagai *FTATM Paper* dan pada umumnya digunakan untuk mengidentifikasi satu individu. *FTATM Paper* merupakan *filtration matrix* yang mengandung bahan tertentu. Bahan tersebut yaitu *protein denaturant* dan *chelating agents*. *Filtration matrix* tersebut mencegah pertumbuhan bakteri dan menginaktifkan bakteri patogen. Ketika sampel diletakkan pada *FTATM Paper*, membran sel akan lisis, kemudian asam nukleat dilepaskan dan DNA berikatan dengan serat/*fiber* dalam *matrix*. Kemampuan DNA berikatan dengan *matrix* mengurangi resiko terjadinya kontaminasi dan mencegah degradasi DNA.¹⁰

Berdasarkan penelitian, ekstraksi DNA dengan metode *FTATM Paper* dapat digunakan untuk ekstraksi DNA dari sampel *bitemark*.

Sampel *bitemark* yang didapatkan dari hasil cetakan alginat pada gigi pasien segera diirigasi dengan *nuclease free water*, kemudian ditetaskan pada *FTATM Paper*. Demikian juga dengan sampel darah, setelah darah diambil dari pasien melalui vena *cubiti*, darah ditetaskan pada *FTATM Paper*. Setelah itu *FTATM Paper* yang mengandung DNA dipotong-potong menjadi $\pm 1-2$ mm untuk dimasukkan ke dalam tabung reagen. Seperti yang telah dibahas sebelumnya, ketika sampel ditetaskan pada *FTATM Paper*, membran sel akan lisis, asam nukleat terlepas, dan DNA akan terjebak di dalam *fiber* dari *matrix FTATM Paper*. Oleh karena DNA terjebak di dalam *fiber matrix FTATM Paper*, maka dapat dipastikan bahwa kadar DNA tidak ada yang berkurang (99%) sehingga tidak perlu dan tidak dapat dilakukan pengukuran kadar DNA. Akan tetapi, dalam kandungan DNA yang diekstraksi dengan *FTATM Paper* masih mengandung kontaminan zat-zat lain yang terdapat dari sampel saliva (*bitemark*) maupun darah. Oleh karena itu, sebelum potongan-potongan *FTATM Paper* dimasukkan ke dalam tabung reagen dan dilanjutkan ke proses amplifikasi PCR, *FTATM Paper* yang telah dipotong-potong sebesar $\pm 1-2$ mm harus dipurifikasi dahulu dengan *FTATM Purification Reagent* untuk menghilangkan kontaminasi zat-zat lain seperti heme dan ion Fe^{2+} yang terdapat dari sampel darah. Ion Fe^{2+} (logam besi) dapat mempengaruhi konsentrasi ion Mg^{2+} (logam magnesium) dan dapat mengganggu proses kerja enzim *Taq Polimerase* yang terdapat pada saat amplifikasi DNA pada PCR. Hal ini dapat menyebabkan konsentrasi DNA menurun saat amplifikasi PCR dan hasilnya tidak optimal. Setelah proses purifikasi, maka hasil ekstraksi DNA pada *FTATM Paper* yang telah bebas kontaminasi dari sampel darah dan sampel *bitemark* serta menunjukkan kadar DNA yang cukup dapat diproses ke langkah selanjutnya yaitu amplifikasi PCR, kemudian diidentifikasi dengan gel elektroforesis.

Pada penelitian ini digunakan beberapa lokus STR untuk pemeriksaan yaitu lokus TH01 dan lokus vWA. Dari hasil elektroforesis yang didapatkan pada kedua lokus ini tidak ada perbedaan yang berarti dari ketebalan *band*. Kedua lokus ini termasuk lokus yang memiliki tingkat mutasi rendah sehingga hasil identifikasi DNA lebih akurat. Hasil penelitian sampel ekstraksi DNA *bitemark* dan darah pada lokus vWA berhasil terdeteksi seluruhnya melalui visualisasi elektroforesis. Demikian pula pada

hasil penelitian sampel ekstraksi DNA *bitemark* dan darah pada lokus TH01 berhasil terdeteksi seluruhnya. Keberhasilan metode ekstraksi DNA ini dapat terlihat dari *band* lokus vWA dan TH01 yang terdeteksi dalam visualisasi elektroforesis pada sampel darah dan *bitemark*.

Kelebihan dari metode *FTATM Paper* ini yang pertama adalah DNA dapat langsung terjebak di dalam *fiber matrix FTATM Paper* yang artinya DNA langsung secara otomatis terekstraksi. Yang kedua adalah *FTATM Paper* yang mengandung *filtration matrix (protein denaturant dan chelating agents)* dapat mencegah pertumbuhan bakteri patogen. Dan yang ketiga adalah DNA yang telah terjebak di dalam *fiber matrix FTATM Paper* tersebut tidak akan berkurang kadarnya dan tidak akan rusak bila disimpan dalam suhu ruangan ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Dengan demikian, maka ekstraksi DNA dengan metode *FTATM Paper* dapat digunakan secara efektif untuk identifikasi DNA dengan menggunakan sampel *bitemark* dan darah untuk penelitian ini.

Dengan demikian, ekstraksi DNA dengan metode *FTATM Paper* dapat digunakan pada sampel *bitemark* untuk proses identifikasi pada kasus forensik. Keberhasilan metode ekstraksi DNA ini dapat terlihat dari terdeteksinya seluruh *band* pada lokus vWA dan TH01 dalam elektroforesis baik pada sampel darah, maupun pada sampel *bitemark*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Winne D.Joan. The Philosophy of DVI on an International Level and the Role of INTERPOL, Presentation at INTERPOL Disaster Victim Identification Regional Meeting, Ujung Pandang, Indonesia. 2000. pp: 42-44.
2. Atmadja, D.S. Peranan sidik jari DNA pada bidang kedokteran forensik. Materi Workshop DNA fingerprinting. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 2005. pp: 178-203.
3. Noto Soehardjo I. Perkembangan ilmu kedokteran kehakiman menuju ilmu kedokteran forensik, Pidato ilmiah pengukuhan guru besar bidang ilmu kedokteran Forensik, Universitas Airlangga, Surabaya. 2003. pp: 1-3.
4. Farley, A. Mark. Forensic DNA technology, Michigan: Lewis

- Publishers Inc, USA. 1991. pp:746-756.
5. Butler J M. Forensic DNA Typing, Academic Press, Sandiego-Florida. 2005. pp 28-30, 59-96.
6. Burgoyne, L., Kijas, j., Hallsworth, P. and Turner, J. Proceedings from the Fifth International Symposium on Human Identification, Madison, Winconsin: Promega Corporation. 1994. pp: 163.
7. Velden A., M. Spiessens., G. Willems. Bitemark Analysis and Comparison using Image Perception Technology. Forensic Odontology Department: Leuven, Belgium. 2006. pp:14-17.
8. Kennedy, D. Forensic Dentistry and Microbial Analysis of Bitemarks. Forensic Biology: University of Otago, Dunedin, New Zealand. 2011. pp: 6-15.
9. Butler J M. Short Tandem Repeat Analysis for human identity testing, STR Typing current protocols in Human Genetic Unit.14.8. 2003. pp: 1-37.
10. Stringer, Peta. Forensic Sampling and DNA databases. Victoria Forensic Science Center. 2002. pp:12-15.